

氏 名	村田 等
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	工 学
学位授与番号	博甲第3652号
学位授与の日付	平成20年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Development of a protein transduction technology using polyethylenimine-cationization, and application to regulation of cellular function (ポリエチレンイミンカチオン化を用いたタンパク質細胞内導入技術の開発と細胞機能の人工制御への応用)
論文審査委員	教授 山田 秀徳    教授 宍戸 昌彦    教授 大森 齋    教授 妹尾 昌治

### 学位論文内容の要旨

生細胞内へタンパク質を導入する技術は、細胞内タンパク質の機能解析や細胞機能の人工制御をはじめ、基礎研究、医療における様々な応用が期待される。我々の研究室ではカチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン (PEI) をタンパク質分子表面に限定的に連結することによって、負電荷を帯びる細胞表面への静電的吸着を介して、高効率にタンパク質を細胞内に導入できることを見出していた。しかし、この技術は簡便性と普遍性に問題があった。そこで私はこれらの問題を解決する「煩雑な化学修飾を必要としないタンパク質導入法の開発」と、「変性状態のタンパク質を細胞内に導入し、機能させる技術の開発」を行った。またタンパク質導入技術の医療への応用を目指して、「がん関連タンパク質の一過的導入による細胞増殖の人工制御」を行った。

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)はグルタチオンとの強い相互作用を示し、GST融合タンパク質の発現システムは目的タンパク質の取得方法としてよく利用されている。私はこの相互作用に着目し、PEIにグルタチオンを連結したGST融合タンパク質細胞内導入キャリアーの開発を行った。様々な化学修飾を施したPEI-グルタチオンキャリアーを合成し、簡便かつ効率的にGST融合タンパク質を細胞内に導入する技術を第1章にまとめた。

タンパク質導入法における大きな問題として、導入に用いるタンパク質を大腸菌に発現させた場合、活性構造をとらずにしばしば変性状態で凝集してしまうために、そのまま細胞導入に用いることができないということがあった。私は不溶性変性タンパク質のシステイン残基を可逆的にカチオン化することによって、変性状態でタンパク質の可溶化を行った。第2章ではこの可逆的カチオン化によって可溶化した変性タンパク質をそのまま細胞に取り込ませ、細胞内で活性構造に巻き戻すIn Cell Folding技術を開発した結果についてまとめた。

第3章ではタンパク質導入技術の医療への応用を目指した研究をまとめた。タンパク質導入技術の利点として、細胞への導入効率が非常に高いこと (ほぼ100%)、細胞内での機能発現が一過的であること、遺伝子導入法とは異なり翻訳産物のタンパク質を直接細胞内に導入するのでゲノムに影響を与えず安全性が高い、などが挙げられる。これらの利点をいかして、増殖を停止した細胞にがん関連タンパク質を導入し、あたかもがん細胞かのように一過的に増殖させる試みを行った。モデルタンパク質として、がん遺伝子SV40T抗原のN末端ドメイン (SVLT-N) を用いた。SVLT-Nの導入による細胞増殖の誘導、SVLT-Nの細胞内での消失時間や遺伝子導入法との比較などを行い、本技術の有効性を証明した。

## 論文審査結果の要旨

ヒトゲノムの情報が明らかとなった現在、その情報を利用した医療研究開発が急速に進められている。その中でタンパク質の機能解析は重要な基盤技術として位置づけられる。申請者の研究室ではポリエチレンジアミン（PEI）カチオン化によるタンパク質細胞内導入・解析技術を開発し、従来の類似技術を大きく凌ぐタンパク質細胞内導入効率を達成していた。しかしこの技術は煩雑な化学修飾を必要とするために、より簡便で普遍的な方法が必要であった。申請者は、これらの問題を解決するための2つの新しい方法と医療への応用を目指したタンパク質導入による細胞増殖の人工制御技術の開発を行った。

第1の方法はグルタチオンとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）の分子間相互作用を利用したGST融合タンパク質の細胞内導入法である。申請者はGST融合タンパク質の細胞内導入キャリアーとしてグルタチオンを繋いだPEIを作製した。このキャリアーによってGST融合タンパク質は効率的に細胞に取り込まれ、細胞内で機能を発揮した。この方法を使えば、任意のタンパク質をGST融合発現システムで作製し、このキャリアーと混合するだけで細胞内への導入、解析が可能となるので非常に簡便で汎用性のある技術であると考えられる。

第2の方法は変性タンパク質を細胞に取り込ませ、細胞内で活性構造に巻き戻し、機能を発現させるIn Cell Folding法である。タンパク質は生産、精製、保存の過程で構造が壊れ、変性・沈殿を生じてしまうことがしばしばある。PEIカチオン化技術を含め、従来の方法では構造をとった可溶性タンパク質のみが細胞導入に利用可能であったので、その適用範囲は限られていた。申請者はタンパク質のシステイン残基の特徴をうまく利用して可逆的なカチオン化を行い、変性タンパク質の利用も可能としたので、In Cell Folding法は様々なタンパク質に適用できる有用な手法であると思われる。

タンパク質カチオン化法による細胞内導入技術は、試験管内の培養細胞に対して均一かつ一過的にタンパク質を導入できることが大きな特徴である。申請者はこの特徴を活用して、がんに関わるタンパク質を導入し、一過的に細胞を増殖させることに成功した。現在、再生医療などの分野では細胞移植に用いるための細胞をいかに増やすか、その技術開発が求められている。本技術はそのような要求に応えるための1つの手段になりうると思われる。以上のように、申請者はこれまでの問題を解決する新規のタンパク質導入技術を開発し、その技術を活用した医用工学への応用例も提示した。したがって、本論文によって示された研究成果は、博士（工学）の学位論文として価値があると認められる。